

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 196 52 586 A 1

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 07 K 7/06  
A 61 K 38/08

21 Aktenzeichen: 196 52 586.1  
22 Anmeldetag: 17. 12. 96  
43 Offenlegungstag: 18. 6. 98

71 Anmelder:  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH  
(GBF), 38124 Braunschweig, DE

74 Vertreter:  
Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Meyer, 81541  
München

72 Erfinder:  
Mühlradt, Peter F., Prof. Dr., 38124 Braunschweig,  
DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Dhc-Peptid und Mittel

57 Die Erfindung betrifft ein S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cysteinpeptid mit zwei esterartig gebundenen langkettigen Fettsäuren an der Dihydroxypropylgruppe und der folgenden Sequenz:  
DhcGN NDE SNI SFK EK. Die Erfindung betrifft ferner ein Mittel mit einem Gehalt an dem genannten Peptid.

DE 196 52 586 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Die makrophagenstimulierende Wirkung von Mykoplasmen ist seit längerer Zeit bekannt; vgl. Loewenstein et al. in Cellular Immunology, 77 (1983) 290–297. Es ist auch vermutet und formal bewiesen worden, daß Lipoproteine aus Mykoplasmen eine derartige Wirkung zeigen; vgl. Herbelin et al. in Infect. Immun., 62 (1994) 4690–4694 und Mühlrad et al. in Biochemistry, 35 (1996) 7781–7786. Lipoproteine aus Gram-negativen Bakterien und Analoga dieser Lipoproteine sind ebenfalls Immunmodulatoren und speziell als Makrophagenaktivatoren beschrieben worden; vgl. Melchers et al. in J. Exp. Med., 142 (1975) 473–482 und Hoffmann et al. in Immunobiol., 177 (1988) 158–170. Diese Spezies von Lipoproteinen tragen N-terminal eine S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-Gruppe (Dhc) mit drei langkettigen Fettsäuren, von denen zwei esterartig und eine amidartig gebunden ist.

Lipoproteine und synthetische Lipopeptidanaloga zeigen eine halbmaximale Wirkkonzentration (Max/2) von etwa  $10^{-7}$  M; vgl. Melchers et al. in J. Exp. Med., 142 (1975) 473–482 und Hoffmann et al. in Biol. Chem. Hoppe Seyler, 370 (1989) 575–582. Synthetische Analoga ohne die Amidfettsäure zeigen eine halbmaximale Wirkkonzentration (Max/2) von etwa  $10^{-8}$  M; vgl. Metzger et al. in J. Peptide Scie., 3 (1995) 184–190. Ferner hat Baschang in Tetrahedron, 45 (1989) 6331–6360, 6352 ein mit Taurin modifiziertes Lipopeptid (Na-Sulfonat; CGP-31 362) beschrieben, das nach Dong et al. in J. Exp. Med., 177 (1993) 1071–1077 noch bei 1 bis 10 ng/ml bzw. 1 bis  $10 \times 10^{-9}$  M makrophagenaktivierend ist. Schließlich beschreiben Metzger et al. in J. Peptide Scie., 3 (1995) 184–190 ein Dhc-Peptid mit der Aminosäuresequenz CFE PPP ATT T, wobei an die 2,3-Dihydroxypropylgruppe zwei Palmitoylgruppen gebunden sind. Die halbmaximale Wirkkonzentration (Max/2) dieses bekannten Peptids beträgt 16 ng/ml bzw.  $10 \times 10^{-9}$  M.

Es besteht jedoch weiterhin ein Bedürfnis nach wirksamen Lipopeptiden.

Erfindungsgemäß wird nun ein S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid mit zwei esterartig an die Dehydroxypropylgruppe gebundenen Fettsäuren, die gleich oder verschieden sein können, vorgeschlagen, wobei das Peptid die folgende Aminosäuresequenz (I):

DhcGN NDE SNI SFK EK (I) bzw.  
Dhcys Gly Asn Asn Asp Gln Ser Asn Ile Ser Phe Lys  
Gln Lys

oder eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit der Sequenz (I) mit der Ausnahme identisch ist, das N-terminal die 2 Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sind.

Erfindungsgemäß können die beiden Fettsäurereste die Formel R-CO- besitzen, wobei R ein C<sub>7-25</sub>-Alkyl-, C<sub>7-25</sub>-Alkenyl- oder C<sub>7-25</sub>-Alkynylrest ist, wobei ungesättigte Reste vorzugsweise in cis-Konfiguration vorliegen. Beispiele für C<sub>7-25</sub>-Alkyl-, Alkenyl- und Alkynylreste sind C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-Reste.

Erfindungsgemäß wird ferner ein Mittel mit einem Gehalt an einem S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid gemäß der Erfindung mit einem üblichen Träger und/oder Hilfsmittel vorgesehen. Das erfindungsgemäße Mittel kann zur Stimulierung der Antikörper-Synthese, zur Vorbeugung gegen Infektionen (anti-infective aktivität), als Immunostimulanz gegen Tumoren, zur Aktivierung von Makrophagen, zur Ausbildung von Toleranz gegenüber Endotoxin bzw. bei septischem Schock, insbesondere bei Gram-negativen Bakterien oder als Vakzin-Adjuvanz (Beimischung zu einem Vakzin) verwendet werden.

Erfindungsgemäß lassen sich S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptide vollsynthetisch herstellen. Der Fachmann kann dabei in Analogie zum angeführten Stand der Technik vorgehen. Verwiesen sei auch auf die DE 35 46 150 A1, DE 37 00 173 A1, DE 38 13 821 A1, DE 41 19 856 A1 und DE 43 29 309 A1.

Nachstehend wird die Erfindung an einem Beispiel näher erläutert.

#### Beispiel

Das Lipopeptid wird aus Mycoplasma fermentans (beispielsweise PG18) präpariert. Die Isolierung des Lipopeptids aus Mykoplasmen erfolgt durch den folgenden bekannten Trennungsgang (Mühlrad et al. in Biochemistry, 35 (1996) 7781–7786).

- (i) Die Delipidierung der Mykoplasmen mit Chloroform/Methanol.
- (ii) Extraktion der delipidierten Mykoplasmen mit heißem 25 mM Octylglucosid.
- (iii) Dialyse dieses Detergens-Extraktes.
- (iv) Konzentrieren des Extraktes durch Gefriertrocknung.
- (v) Umkehrphasen-Chromatographie auf einer C8-Säule mit einem Wasser/2-Propanol-Gradienten.

Die Detektion der biologischen Aktivität erfolgt, indem man Nitrit und Nitrat als Folgeprodukte von Stickstoffmonoxid mißt, das bei Stimulation von interferonbehandelten murinen Peritonealmakrophagen freigesetzt wird.

Der Wirkstoff ist ein S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid mit zwei esterartig gebundenen langkettigen Fettsäuren (C16 : 0 und C18 : 0/C18 : 1) an der Dihydroxypropylgruppe und mit der folgenden Sequenz: Dhc-GNN DES NIS FKE K. Das häufigste Molekulargewicht beträgt 2164. Daneben können Varianten ermittelt werden, die sich durch unterschiedliche Fettsäuren und durch ein um zwei Aminosäuren C-terminal verkürztes Peptid auszeichnen.

Die Substanz besitzt die Eigenschaft, Makrophagen von Mäusen und Menschen zur Freisetzung von Zytokinen und prostaglandinen zu stimulieren, und zwar mit allen Konsequenzen der indirekten Stimulation von T- und B-Lymphozyten; vgl. Mühlrad et al. in Infect. Immun., 59 (1991) 3962–3968 und Feng & Lo in Infect. Immun., 62 (1994)

3916-3921. Ihre halbmaximale Wirkkonzentration (Max/2) beträgt 20 pg/ml bzw.  $10^{-11}$  M im Maussystem. Diese Wirkkonzentration ist um den Faktor  $10^2$  bis  $10^3$  geringer als die entsprechenden bekannten Konzentrationen ähnlicher natürlicher oder synthetischer Lipopeptide.

## Patentansprüche

1. S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid mit zwei esterartig an die Dihydroxypropylgruppe gebundenen Fettsäuren, die gleich oder verschieden sein können, wobei das Peptid die folgende Aminosäuresequenz (I)

DhcGN NDE SNI SFK EK

oder eine Aminosäuresequenz aufweist, die mit der Sequenz (I) mit der Ausnahme identisch ist, daß N-terminal die Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sind.

2. S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Fettsäurereste die Formel R-CO- besitzen, wobei R eine  $C_{7-25}$ -Alkyl-,  $C_{7-25}$ -Alkenyl- oder  $C_{7-25}$ -Alkynylgruppe ist, wobei ungesättigte Reste vorzugsweise in cis-Konfiguration vorliegen.

3. Mittel mit einem Gehalt an einem S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptid gemäß Anspruch 1 oder 2 neben einem üblichen Träger und/oder Hilfsmittel.

4. Mittel nach Anspruch 3 zur Stimulierung der Antikörper-Synthese.

5. Mittel nach Anspruch 3 zur Vorbeugung gegen Infektionen (anti-infective activity).

6. Mittel nach Anspruch 3 zur Immunostimulanz gegen Tumoren.

7. Mittel nach Anspruch 3 zur Aktivierung von Makrophagen.

8. Mittel nach Anspruch 3 zur Ausbildung von Toleranz gegenüber Endotoxinen (septischer Schock), insbesondere bei Gram-negativen Bakterien.

9. Mittel nach Anspruch 3 als Vakzin-Adjuvanz (Beimischung zu einem Vakzin).

BEST AVAILABLE COPY

- Leerseite -

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**